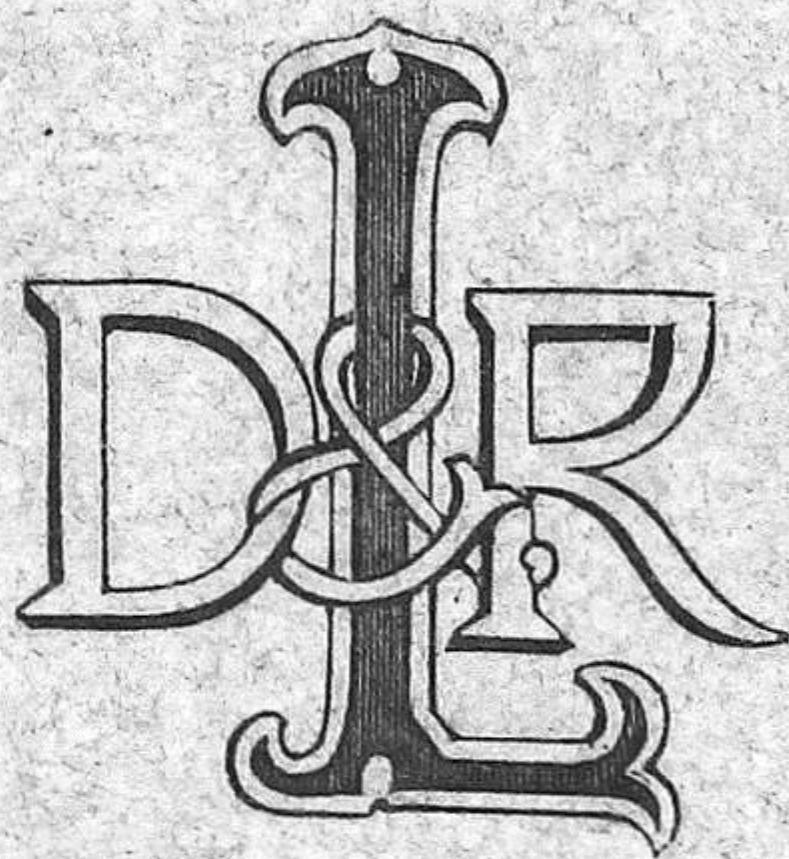
Istituto della 2ª Clinica Medica della R. Università di Napoli
diretto dal Prof. A. CARDARELLI.

LA LEUCOCITOSI
IN RAPPORTO DEL
POTERE ANTITOSSICO NATURALE
E DEL
PROCESSO D'IMMUNITÀ ATTIVA

PER IL

Dottor M. CRISPINO

(Estratto dal *Giorn. Inter. delle Sc. Med.*, Anno XXI).

NAPOLI
LIBRERIA DETKEN & ROCHOLL
Piazza Plebiscito
1899

Istituto della 2ª Clinica Medica della R. Università di Napoli
diretto dal Prof. A. CABDARELLI.

LA LEUCOCITOSI

IN RAPPORTO DEL

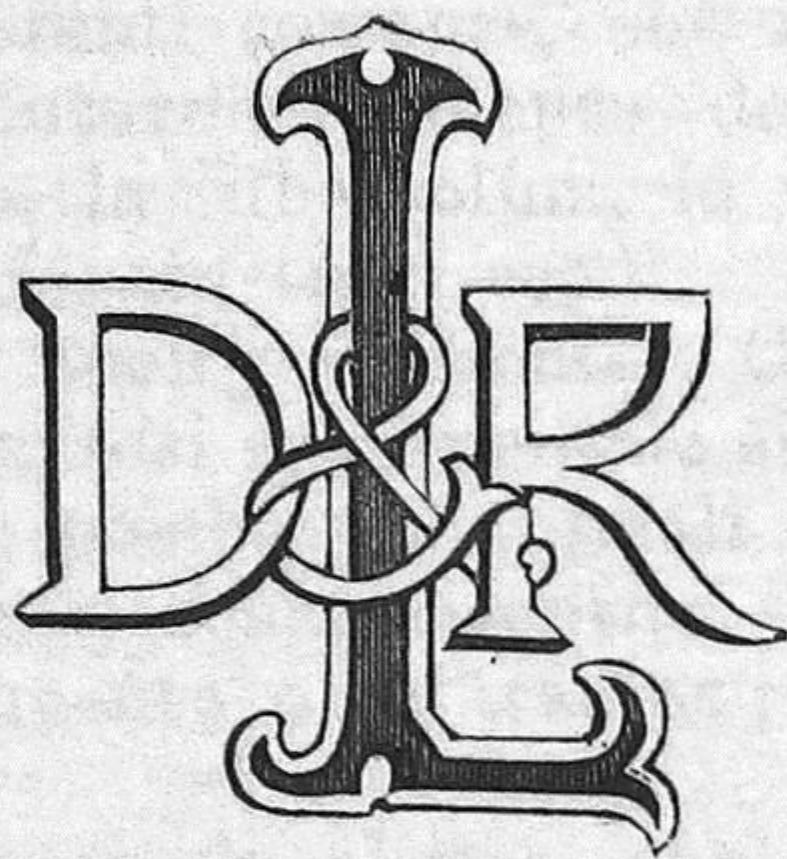
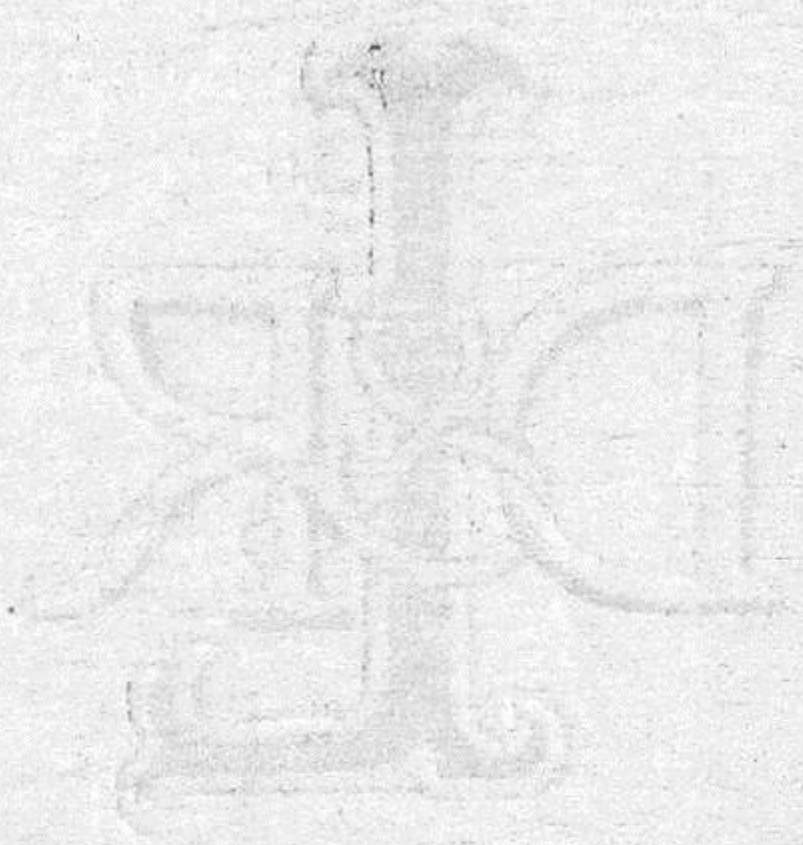
POTERE ANTITOSSICO NATURALE

E DEL

PROCESSO D'IMMUNITÀ ATTIVA

PER IL

Dottor M. CRISPINO

(Estratto dal *Giorn. Inter. delle Sc. Med.*, Anno XXI).

NAPOLI
LIBRERIA DETKEN & ROCHOLL
Piazza Plebiscito
1899

La maggior parte di coloro, che hanno studiato sull' influenza della leucocitosi, si sono serviti di metodi indiretti, o per meglio dire negativi; giacchè trattasi di processi differenti, tutti intesi a diminuire il numero dei leucociti nel sangue.

Così Damys (1) ha usato il metodo della filtrazione; Löwit (2) la legatura dell'arco aortico; alcuni hanno usato veleni, aventi la facoltà di diminuire l'attività degli organi deputati alla produzione dei leucociti, come la trementina, la coltura senza bacilli di tubercolosi (Richet), (3) e molti il raffreddamento degli animali di esperimento, come ha fatto Rovighi (4).

D'altra parte non sono mancati autori, in questi ultimi tempi, che, per ottenere la iperleucocitosi a scopo sperimentale, si sono serviti di differenti sostanze, che introdotte nell'organismo, inducono un notevole aumento dei corpuscoli bianchi, come la pilocarpina, la tubercolina, la spermina, gli estratti di organi animali (fegato timo ecc.).

Così hanno fatto Loewy e Richter, Caro e Jakob (5). Con tal metodo la leucocitosi sperimentale si presta benissimo agli studii comparativi; poichè gli animali possono assoggettarsi a reiterati esperimenti senza risentire i danni, come per condizioni di avvelenamento o di trauma; e la tecnica è oltremodo semplificata.

Oramai non s'ignora da alcuno, che la maggior parte di queste sostanze, attivanti la leucocitosi organica, debbano questa loro proprietà alla nucleina, che contengono, e che la nucleina sia l'elemento più attivo, che si conosca per la produzione dei leucociti.

La letteratura recente è esuberantemente ricca di lavori al riguardo: e dopo le pubblicazioni di Kossel e di Horbackzewski (6), ai quali spetta il vanto di aver fatto le prime in-

vestigazioni sulla nucleina, noi ci troviamo di possedere una larga conoscenza sulle proprietà biologiche di questa nuova sostanza, non solo per ciò, che si riferisce alla sua facoltà leucotattica, ma ancora per l' importanza, che le si assegna nei rapporti del ricambio materiale.

In tanto per effetto di questi nuovi studii non solo viene indiscutibilmente riconosciuta la proprietà leucocitogena della nucleina; ma si comincia ad usarla a scopo terapeutico e sperimentale.

Sée (7) riferisce all'accademia di Parigi, che la nucleina produce un aumento costante di globuli bianchi, assicurando che non arreca alcun disturbo fisiologico. Egli l'adopera come sostanza fagocitaria, e propone d' impiegarla in luogo della tubercolina nella diagnosi della tubercolosi e come mezzo terapico nella pneumonite.

H. Mourek (8) ha usato la nucleina per iniezione ipodermica nel Lupus, ed ha notato la sua proprietà pirogenica, leucotattica ed attivante i processi infiammatorii cronici.

Vanghan (9) crede, che la nucleina attivi non solo la leucocitosi, ma ancora la formazione delle emasie.

Garber (10) opina, che gli estratti animali, con cui si ottiene la guarigione e miglioria di alcune malattie, agiscono per la nucleina, che contengono.

Maurit-Bleyer (11) ha impiegato la nucleina in 52 casi di difterite, e Feigen (12) nella tubercolosi; e l'uno nota una azione quasi specifica, e l'altro non sa attribuirne i favorevoli effetti, se a virtù propria, od alla facoltà leucotattica.

Jakobson (13) l'adopera in casi di tossiemia: ed Aulde (14) ultimamente propone di darla nel tifo.

Per le relative indagini genetiche sulla provenienza e formazione dell'A. urico e corpi affini da Stadthagen, Horbackzewski, Gumlich, Richter, Zagari e Pace (15) la nucleina è stata usata a scopo sperimentale sia nell'uomo, sia nell'animale (cane).

Da questo breve cenno letterario sulla nucleina emerge chiaro, come nessun dubbio possa oramai più sussistere sul fatto, che questa sostanza induca costantemente nell'organismo animale un aumento dei globuli bianchi, e come per raggiungere questo scopo soddisfi alle esigenze sperimentali.

Epperò dovendo indurre delle variazioni quantitative della leucocitosi, per studiarne i rapporti con il potere antitossico, tra i differenti metodi e mezzi suaccennati, ho preferito servirmi appunto della nucleina, adoperandola nel modo, che andrò descrivendo.

Fra le diverse specie di nucleina, ottenute da differenti sostanze, ho usata quella, estratta dal lievito di birra, che, secondo le indicazioni di Hrbackzewski, può, opportunamente sciolta in una soluzione di soda, somministrarsi per via ipodesmica. Essa va così preparata: 0,50 gr. di nucleina si triturano in un mortaio, aggiungendo lentamente a gocce una

soluzione di soda al 5 0[0 finchè si sciolgano: alla soluzione ottenuta si addizionano 0,50 gr. di acido carbonico ed acqua distillata fino a 100 cmc. Così un centimetro cubico di questa soluzione contiene 0,005 gr. di nucleina. La soluzione così ottenuta è limpida, color malaga, produce spuma con l'agitarsi, ed iniettata sotto cute, non dà luogo a reazione di sorta (16).

Abbenchè sia risaputo, che la nucleina aumenti costantetemente e notevolmente il numero dei leucociti nell'organismo animale, io ho voluto ricercare con ripetute osservazioni la proprietà leucotattica della nucleina, da me usata; tanto più che premeva di assicurarmi in precedenza del limite medio dell'aumento possibile della leucocitosi nell'animale, su cui mi accingevo a sperimentare.

La quantità di nucleina, di cui ho indagato l'esponente leucotattico è stata di 0,005 gr., corrispondente ad un cmc. della soluzione da me preparata; e l'animale, su cui ho fatte le mie ricerche, è stato il coniglio.

Ognuno conosce quanto possa essere variabile, anche in condizioni fisiologiche, la quantità dei leucociti non solo tra individui differenti, ma ancora nello stesso individuo per ragioni generali e locali (epoca della digestione, temperatura, stimolazioni locali); epperò mi sono dovuto circondare di alcune garanzie, per ottenere dei risultati attendibili.

Ho cercato di eseguire gli esami globulimetrici del sangue dei conigli quasi sempre ad ora determinata, ed ad una data distanza dell' abituale rifornimento di vitto Il sangue è stato preso sempre all' istesso modo, infiggendo un ago ricurvo nella vena mediana dell'orecchio, su cui evitavo di portare stimolo di qualunque genere. Ed allorchè l'esame del sangue nello stesso coniglio si ripeteva, per riscontrare gli effetti leucotattici della nucleina, io non ho preso mai il sangue dallo stesso orecchio, che precedentemente l'avea fornito. A tutto ciò debbo aggiungere, che questo secondo esame si eseguiva tre ore dopo della somministrazione ipodermica della nucleina, quantità di tempo presumibilmente necessario, perchè il suo effetto potesse esplicarsi nell'organismo.

L'apparecchio, di cui mi son servito per la numerazione dei leucociti, è stato quello di Thoma Zeiss, adoperando il leucocitometro con la relativa soluzione di acido acetico al 1[3 0[0. Per ciascun esame ho proceduto a parecchie conte, per evitare l'errore della diversa distribuzione degli elementi globulari nella soluzione; e nel metodo della numerazione ho preferito il più semplice, benchè il più lungo, cioè ho contato tutti i leucociti nel loro numero totale, contenuto nel millimetro quadrato. Spesso ho controllato i risultati, adoperando l'emoglobulimetro, col quale contavo non solo i globuli bianchi, che venivano colorati dal violetto di genziana, addizionato alla soluzione di cloruro di sodio, ma ancora le emasie.

Riporto il risultato delle varie enumerazioni fatte su diffe-

renti conigli, avendo avuto cura di non ripetere le osservazioni sullo stesso coniglio, se non a distanza di più giorni.

Osservazione	Leucociti allo stato normale	Leucocitosi post-nucleinica
1ª	5800	10300
2ª	8400	12400
3ª	5900	14000
4ª	9900	11400
5ª	6400	14800
6ª	7500	12100
7ª	6300	11100
8ª	8000	17000
9ª	6500	12000
10ª	8000	16300
11ª	6500	13200
12ª	6700	12400
13ª	7000	14800
14ª	9300	12200

Sommando i risultati di queste differenti osservazioni e facendone la media, si ha, che il numero dei leucociti nel coniglio allo stato normale corrisponde a 7300 per millimetro cnbico, mentre quello dei conigli, sottoposti all' influenza della nucleina, sale a 13100. Paragonando queste due cifre, si ha una differenza notevele: 5800, che rappresenta in media l' aumento del numero dei leucociti nel coniglio per opera della nucleina: e quest' aumento messo in ragione del numero medio dei leucociti, allo stato normale (5800; 7300), stabilisce il rapporto del 79,44 %.

Adunque la nucleina, da me usata, nella quantità di 0,005 gr;

ha pel coniglio un potere leucotattico abbastanza elevato, che non differisce molto da quello assegnatole ad essa da Horbackzewsk (17), il quale ne stabilisce il limite massimo alla ragione dell' 83 %.

Siccome poi da qualche autore (Vaughan) è stato riferito, che la nucleina aumenti eziandio il numero degli eritrociti, ho voluto, trovandomi a trattare quest'argomento, dedicarvi uno sguardo fugace, Ed ho potuto constatare, che se la media delle emasie nel coniglio, in condizioni fisiologiche, è di 4,200,000 per m. m. c., dopo l'azione della nucleina la media ascende a 4,800,000, con una plusvalenza dì 600,000; cosicchè dalle mie ricerche risulterebbe confermato il principio, che anche i globuli rossi vengono influenzati dall' azione della nucleina. Unisco assieme questi risultati globulimetrici, perchè potesse meglio valutarsi l'azione globuligena di questa sostanza.

Stato normale	Emasie 4,200,000 Leucociti 7,300 Rapporto tra L: ed E: 1 : 680
Stato postnucleinico	Emasie 4,800,000 Leucociti 13,100 Rapporto tra L: ed E: 1 : 374

Potere eritrotattico 14 : 100
Potere leucotattico 79 : 100

I.

Potere antitossico Naturale.

Risparmiandomi di parlare delle differenze biologiche tra i veleni chimici e le tossine, ricordo appena, che per queste ultime si ammette un periodo d' incubazione: le tossine, cioè non agiscono direttamente negli organi dell' economia ed in proporzione della loro quantità, come avviene per i veleni chimici: esse invece hanno bisogno d' influenzare e di essere influenzato da certe attività cellulari ed umorali, perchè possano riuscire tossiche. Questo lavoro intimamente biologico ha bisogno di compiersi in un dato tempo, che chiamansi periodo d' incubazione, ed è fino ad un certo punto indipendente dalla quantità di tossina, che inficia l' organismo.

Il periodo d' incubazione difficilmente é precisabile per le differenti tossine, che si esperimentano, all'istesso modo come può farsi per i batterii; sicchè noi non passiamo agevolmente conoscere quando cominci, il periodo della resistenza verso la tossina dopo quello dell' incubazione. Perciò in pratica convenendo di chiamare potere antitossico naturale quella certa resistenza, che l' organismo oppone verso una determinata tossina, noi non abbiamo altro mezzo per valutarlo, che quello del tempo, che va dall' inoculazione alla morte, confondendo in una cosa sola periodo d' incubazione e periodo di resistenza.

Questo potere antitossico è sostenuto per niente dalla leucocitosi?

Nel giuoco complesso della resistenza organica alle tossine hanno le loro parte i globuli bianchi?

Dovendo scegliere una tossina per lo studio di quest' argomento, io ho preferito una tossina vegetale, la Ricina: 1°) per avere una tossina, sulla cui virulenza non potesse sorgere alcun dubbio, derivante da metodi di preparazione, 2°) per allontanare ogni idea batterica, che avesse potuto dar luogo a confusione di interpretazione, 3°) per comodità di esperimento, essendo la ricina una tossina, che può sempre prepararsi in poche ore, ove occorra rifarne la soluzione.

Tacendo della storia della ricina, adoperata per la prima volta da Ehrlich; ed essendo noto il metodo per prepararne delle soluzioni ad uso ipodermico (18), osservo solamente, che mi sono servito in tutte le mie ricerche della medesima soluzione senza avervi riscontrata alcuna apprezzabile diminuzione di virulenza.

Essa era stata preparata nella proporzione di 1 : 10,000; di guisa che un cmc: contenesse gr: 0,0001 di ricina.

Seguendo poi la norma di precedenti sperimentatori, che avevano assegnata la quantità di gr. 0,0003 di ricina per ogni Kg. di coniglio, come dose minima mortale dello stesso, io ho potuto su questa indicazione iniziare le mie ricerche.

Ad una prima serie di otto conigli ho inoculato sottocute la ricina nella dose di gr: 0,0003 per ogni Kgr: (quantità corrispondente a 3 cmc: delle soluzione: e ad una seconda serie di altri otto conigli ho iniettato oltre alla medesima quantità di tossina, gr. 0,005 di nucleina per ciascun coniglio, (1 cmc: della sol: di Horbackzewski).

Per la speciale reagibilità individuale all' azione leucotattica della nucleina, non ho creduto proporzionarla al peso degli animali, i quali del resto non differivano gran che tra di loro.

I conigli della 1ª serie trattati con la sola ricina sono stati messi in osservazione, nè più toccati fino al tempo che son venuti a morire. In quelli invece della 2ª serie l' inoculazione di 0,005 di nucleina per animale è stata ripetuta ogni 24 ore, finchè non sia sopraggiunta la morte; e ciò allo scopo di mantenere in essi sempre attiva la leucocitosi sperimentale.

Le due serie di conigli adunque hanno ricevuto il medesimo trattamento per rispetto alla ricina, somministrata in una volta sola nelle identiche norme e condizioni; ma differiscono tra loro per il trattamento nucleinico, fatto quotidianamente ai soli conigli della 2ª serie.

La inoculazione delle due sostanze, ricina e nucleina veniva fatta in parti differenti, e possibilmente lontane, del corpo degli animali; ed ho usato, per ciascuna di esse, speciali provette e siringhe, acciocchè fosse esclusa qualunque dubbio di

indole chimica sul possibile contatto esteriore tra la tossina e la nucleina.

Queste precauzioni del resto debbono quasi considerarsi superflue dopo la pubblicazione di recenti lavori. Freund, Grosz e Jelinek infatti, hanno dimostrato (19), che la nucleina, mescolata con tossine, e digerita per 20 ore a 37° non paralizza l'azione delle tossine. F Tichamiroff (20) ultimamente ha osservato, che se in vitro la nucleina precipita le tossine dalle loro soluzioni, ciò che ha riscontrato ancora per la ricina, i precipitati sono dotati delle medesime qualità biologiche, e più di tutto sono egualmente tossici.

I risultati di questo differente trattamento sono esposti nella seguente

TAVOLA I.

1.ª Serie				*2.ª Serie*			
Ricina				**Ricina e Nucleina**			
Numero	Peso in grammi	Quantità di tossina in cmc.	Ore di vita	Numero	Peso in grammi	Quantità di tossina in cmc.	Ore di vita
1	1860	5,58	44	2	2000	6,00	111
3	16'.5	5,02	45 3/4	4	1770	5,21	47
5	1750	5,25	41	6	1725	5,17	114
7	1820	5,46	53	8	1850	5,65	148
9	1900	5,70	36	10	1680	5,04	42
11	1750	3,25	44 1/4	12	1950	5,85	268 1/2
13	1860	5,38	43 3/4	14	1630	4,89	50
15	2050	6,15	48	16	1880	5,64	160
			Totale Ore 355 3/4				Totale Ore 946
			Media individuale Ore 44				Media individuale Ore 118 1/2

Rapporto 1 × 2,66.

Come di leggieri si vede da questo quadro, tanto gli otto conigli trattati con la dose m. m. di ricina, quanto gli otto conigli, che oltre alla dose m. m. di ricina sono stati assoggettati all' azione leucotattica quotidiana della nucleina, sono venuti a morire; ma una notevole differenza offrono le due serie di conigli nel rapporto del tempo interceduto tra l' ino-

culazione della tossina e la morte. Di fatti il numero complessivo delle ore di vita negli animali della 1ª serie ascende a 355 3/4 con una media individuale di ore 44; laddove il numero complessivo delle ore di vita nella 2ª serie sale fortemente a 944 3[4 con una media di ore 118 per individuo. Il rapporto tra questi risultati rappresentato dalla proporzione di 1 : 2,66 fa chiaramente vedere, che la vita nei conigli della 2ª serie sia stata quasi triplicata.

Particolarmente però si osserva, che non tutti i conigli nucleinizzati si siano comportati all'istesso modo; poichè tre di essi: n. 4, n. 10, n. 14 sono morti dopo un tempo, che va da 42 a 50 ore, vivendo così approssimativamente un numero di ore quasi uguale alla media, con cui sono vissuti i conigli non trattati con la nucleina (ore 44). Questi tre conigli, per ragioni, che non m'è data provare, parrebbe siano rimasti indifferenti all'azione della nucleina.

Ciò non pertanto, tenendo presente che nella maggioranza dei conigli assoggettati all'influenza della nucleina': n. 2, n. 6, n. 8, n. 12, n. 16, cioè cinque su otto, la morte per intossicamento ricinico è stata così notevolmente ritardata, essendo avvenuta fra un minimum di ore 111 (n. 2) ed un maximum di ore 263 3/4 (n. 12); e notando, che i conigli testimoni son venuti tutti a morire quasi contemporaneamente tra un minimum di ore 36 (n. 9) ed un maximum di ore 53 (n. 7); apparisce ben chiaro come, sotto l'influenza della nucleina, si sia marcatamente aumentata la resistenza verso la ricina.

Nè ciò potrebbe addebitarsi ad una singolare resistenza organica individuale di fronte alla tossina; poichè la quantità di ricina inoculata alle due serie di conigli, è una dose così altamente tossica da non poter concedere, che un limite molto ristretto alla resistenza organica individuale. Nei conigli testimoni, in fatti la resistenza organica individuale non ha mostrata alcuna notevole oscillazione: essa, come si è visto, varia da 36 a 53 con una differenza di ore 18, cifra molto bassa in confronto del forte aumento subito dai conigli nucleinizzati.

Esclusa così questa possibilità, ed escluso ancora il dubbio, per i lavori di Freund, Grosz, Jelinek e Tichamiroff, che la nucleina possa diminuire la tossicità della ricina, ciò, che indirettamente sarebbe confermato altresì dal fatto, che, in tre dei conigli nucleinizzati, la nucleina non ha mostrato alcuna efficacia, non vi resta, che attribuire all'azione biochimica di questa sostanza l'aumento del potere antitosssico, osservato negli animali della 2.ª serie.

E siccome quest'influenza della nucleina coincide massimamente e costantemente con un aumento dei leucociti nell'organismo, si può con tutta probabilità mettere a conto della leucocitosi la resistenza maggiore opposta alla ricina dai conigli nucleinizzati.

In base di questa veduta e dei precedenti risultati reste-

rebbe dimostrato, che *la leucocitosi aumenti il potere antitossico naturale.*

II.

Immunità Attiva.

Partendo dalla nozione, che la leucocitosi sperimentale aumenti il potere antitossico naturale, sono passato a vedere, come la stessa si comporti sul proposito dell'immunità attiva, studiandone gli effetti, sia per rispetto al potere vaccinante, sia per rispetto all'elaborazione dell'antitossina.

a) Potere vaccinante.

Poiché dopo il risultato delle precedenti esperienze, si poteva sospettare, che la leucocitosi avesse potuto accrescere anche il potere vaccinante, favorendo così una più rapida immunizzazione degli animali contro la ricina, io per conciliare questa previsione con le esigenze dei posteriori esperimenti, sulla formazione dell'antitossine, ho dato il seguente indirizzo alle mie ricerche.

Ho adoperato un doppio metodo di vaccinazione, contro la ricina: uno costituito da piccole dosi di tossina, con le quali si perveniva alla dose minima mortale in un lungo ciclo; e l'altro, fatto con dosi di tossina più forti, che raggiungeva la d: m: m: in un ciclo più breve.

Per distinguere questi due metodi di vaccinazione: ho dato al primo il nome di *metodo ordinario*, ed al secondo quello *di metodo rapido.*

Nel metodo ordinario di immunizzazione attiva la vaccinazione va dalla dose di un diecimilionesimo di gr: di ricina, per Kgr: di coniglio, fino alla dose di tre diecimilligrammi, quantità stabilita come d: m: m:, e l' intero ciclo si espleta in giorni trenta.

Nel metodo rapido invece la forma dell'immunizzazione è controdistinta dal fatto, che le dosi quotidiane di tossina sono quasi doppie di quelle del metodo ordinario, partendosi dalla quantità di due diecimilionesimi per Kgr:, per arrivare alla d: m: m: in giorni diciassette.

Alla vaccinazione ricinica, fatta con il metodo ordinario, è stato sottoposto un sol gruppo di sei conigli: n. 1, n. 2, n. 3, n. 4, n. 5, n. 6.

Al metodo rapido di vaccinazione invece sono stati assoggettati due gruppi di conigli, uno composto di otto conigli n. 7, n. 8, n. 9, n. 10, n. 11, n. 12 n. 13, n. 14; e l'altro di quattro conigli n. 15, n. 16, n. 17, n. 18.

Di questi due gruppi, vaccinati con metodo rapido, il primo, all'infuori della vaccinazione ricinica, ha avuto il tratta-

mento nucleinico quotidiano, fatto con le norme già indicate, ed il secondo è servito da testimone.

Il differente trattamento per questi tre gruppi di conigli viene esposto più chiaramente nella seguente

TAVOLA II.

1° Gruppo Conigli		2° Gruppo Conigli			3° Gruppo Conigli	
N. 1-N. 2-N. 3 N. 4-N. 5-N. 6		N. 7-N. 8-N. 9-N. 10 N. 11-N. 12-N. 13-N. 14			N. 15-N. 16 N. 17-N. 18	
Metodo ordinario		Metodo rapido e Nucleina			Metodo rapido	
Giorno	Ricina in gr.	Giorno	Ricina in gr.	Nucleina in gr.	Giorno	Ricina in gr.
1	0,0000001	1	0,0000002	0,005	1	0,0000002
2	0,0000002	2	0,0000004	0,005	2	0,0000004
3	0,0000003	3	0,0000006	0,005	3	0,0000006
4	0,0000004	4	0,0000008	0,005	4	0,0000008
5	0,0000005	5	0,000001	0,005	5	0,000001
6	0,0000006	6	0,000002	0,005	6	0,000002
7	0,0000007	7	0,000004	0,005	7	0,000004
8	0,0000008	8	0,000006	0,005	8	0,000006
9	0,0000009	9	0,000008	0,005	9	0,000008
10	0,000001	10	0,00001	0,005	10	0,00001
11	0,000002	11	0,00002	0,005	11	0,00001
12	0,000003	12	0,00004	0,005	12	0,00004
13	0,000004	13	0,00006	0,005	13	0,00006
14	0,000005	14	0,00008	0,005	14	0,00008
15	0,000006	15	0,0001	0,005	15	0,0001
16	0,000007	16	0,0002	0,005	16	0,0002
17	0,000008	17	0,0003 (d.m.m)	0,005	17	0.0003 (d.m.m.)
18	0,00009					
19	0,00001					
20	0,00002					
21	0,00003					
22	0,00004					
23	0,00005					
24	0,00006					
25	0,00007					
26	0,00008					
27	0,00009					
28	0,0001					
29	0,0002					
30	0,0003 (d.m.m.)					

A termine dei singoli processi immunizzanti, cioè al 17 giorno per il metodo rapido, ed al 30.° pel metodo ordinario, io ho inoculato per ciascuna volta ad un coniglio testimone la d: m: m: di ricina allo scopo di controllarne la virulenza. Il testimone, che insieme ai conigli del 2.° e 3.° gruppo ha ricevuta la d: m: m:, è morto dopo ore 45; e quello inoculato della medesima quantità di tossina, contemporaneamente ai conigli del 1.° gruppo, è morto dopo ore 43 $^1/_2$. Di questi conigli testimoni l'autopsia e l'esame batteriologico negativo hanno confermato le note dell'intossicamento ricinico e l'inalterata virulenza della tossina.

Istituendo questi tre gruppi di conigli, variamente sottomessi all'immunizzazione attiva contro la ricina: 1.° gruppo (metodo ordinario), 2.° gruppo (metodo rapido e nucleina), 3.° gruppo (metodo rapido), riesce abbastanza facile lo studio sulle possibili modificazioni, che il potere vaccinante subisca sotto l'influenza della leucocitosi.

Dappoichè, comparando i risultati dei primi due gruppi, si potrà agevolmente scorgere, se la vaccinazione contro la ricina, prodottasi nei conigli del 1.° gruppo, vaccinati con piccole dosi di tossina e nel periodo di 30 giorni (metodo ordinario) si compia ugualmente, a ragione della leucocitosi, con più forti dosi di tossina e nello spazio di giorni 17, nei conigli del 2.° gruppo (metodo rapido e nucleina).

Ma i conigli di questo 2.° gruppo differiscono da quelli del 1.° non solo pel trattamento nucleinico, ma altresì per la rapidità del motodo di vaccinazione; cosicchè gli effetti della leucocitosi nucleinica avrebbero potuto confondersi con quelli derivanti dal metodo di vaccinazione; e perciò si è stabilito il controllo del 3.° gruppo (metodo rapido), sottomesso al medesimo tipo di vaccinazione ricinica del 2.° gruppo.

La seguente tavola espone i risultati ottenuti complessivamente con l'espletarsi dei cicli di vaccinazione.

TAVOLA III.

Gruppo	Metodo	Morte durante la Vaccinazione	Morte dopo la Vaccinazione	Resistenza alla Vaccinazione
1° Gruppo	Metodo ordinario di Vaccinazione			Con. N. 1
			Con. N. 2	
				Con. N. 3
				Con. N. 4
				Con. N. 5
				Con. N. 6
2° Gruppo	Metodo rapido di Vaccinazione e Nucleina		Con. N. 7	
				Con. N. 8
		Con. N. 9		
		Con. N. 10		
		Con. N. 11		
				Con. N. 12
		Con. N. 13		
		Con. N. 14		
3° Gruppo	Metodo rapido di Vaccinazione			Con. N. 15
				Con. N. 16
		Con. N. 17		
				Con. N. 18

Giudicando sulla totalità dei conigli appartenenti a questi tre differenti gruppi, è da osservare in generale, che alcuni sono morti durante il processo di immunizzazione; altri benchè espletato il ciclo immunizzante, sono morti, pochi giorni dopo la fine del processo; ed alcun'altri, tenuti per 10 giorni

in osservazione, dopo il termine dell'immunizzazione, sono stati uccisi per dissanguamento, e dal loro sangue, si è ricavato il siero occorsomi per ulteriori esperienze.

Singolarmente si nota, che dei sei conigli del 1.° gruppo (metodo ordinario) tutti hanno raggiunto la d: m: m:, un solo è morto otto giorni dopo la fine del processo, ed i rimanenti hanno fornito il relativo siero.

Negli otto conigli del 2.° gruppo (metodo rapido e nucleina) cinque animali soccombono durante il processo vaccinante, uno sopporta la d: m: m:, ma muore al sesto giorno d'osservazione, e due soli appena arrivano ad espletare il ciclo immunizzante ed a pervenire al decimo giorno d'osservazione, a capo del quale vengono ammazzati.

Laddove nel 3.° gruppo (metodo rapido), dei quattro conigli, uno muore durante la vaccinazione, e tre raggiunta la d: m: m: ed il decimo giorno d'osservazione, sono ugualmente uccisi.

Paragonando i risultati ottenuti nel 1° gruppo (metodo ordinario) con quelli occorsi nel 2° gruppo (metodo rapido e nucleina), si osserva chiaramente, che la resistenza alla vaccinazione opposta, dai conigli del 1°, non si riscontra affatto in quelli del 2.°. In questi la maggioranza degli animali, 5 su 8, è morta durante l'immunizzazione, sicchè sembra, che l'influenza leucotattica della nucleina non abbia per niente sostenuto ed aumentato il potere vaccinante: In condizioni contrarie, la vaccinazione sarebbesi potuta compiere più facilmente in un maggior numero di animali, non ostante la rapidità del metodo vaccinante.

Dal paragone poi dei risultati dello stesso 2° gruppo con quelli ottenuti nel 3° (gruppo testimone) si vede, che non ostante l'eguaglianza del metodo di vaccinazione, comune ai due gruppi, gli animali del 3° gruppo hanno maggiormente resistito, essendone morto durante l'immunizzazione 1 su 4. Cosicchè risulta, che i conigli, immunizzati con metodo rapido, sotto l'influenza dell'azione leucotattica della nucleina, si siano vaccinati contro la ricina meno di quelli, che assoggettati all'istesso metodo di vaccinazione rapida, non hanno subìta l'influenza della nucleina.

Parrebbe adunque, giudicando complessivamente, che il potere vaccinante non solo non sia stato aumentato dalla leucocitosi sperimentale nei conigli del 2° gruppo, ma sia rimasto diminuito sensibilmente a causa del trattamento leucocitogeno. Cosicchè la leucocitosi sperimentale, secondo queste ricerche, da una parte, risulterebbe, che non abbia aiutato il processo di vaccinazione antitossica verso la ricina, e dall'altra abbia contribuito a scemare notevolmente le proprietà vaccinanti.

Conseguentemente a tali risultati si verrebbe alla duplice conclusione:

1.°) Nel processo d'immunità attiva la vaccinazione si com-

pie indipendentemente dall'aumento dei leucociti nell'organismo

2.° Sotto l'influenza della leucocitosi sperimentale le proprietà vaccinanti restano sensibilmente abbassate.

b) Sviluppo di antitossina.

L'altra parte, che rimane a studiare nell'influenza della leucocitosi nel processo d'immunità attiva, riguarda la formazione dell'antitossina. Vedere cioè, se questo si sviluppi nell'organismo immunizzato indipendentemente dalla leucocitosi, o ne risenta un'influenza qualsiasi.

In questa indagine io mi son servito del siero raccolto con tutte le debite cautele dal sangue dei conigli, variamente immunizzati contro la ricina; e che, come innanzi ho detto, erano uccisi per dissanguamento dopo 10 giorni dalla fine del processo immunizzante.

Questo siero va distinto per la sua provenienza in

1°) siero *A* di conigli immunizzati con metodo ordinario.

2°) siero *B* di conigli immunizzati con metodo rapido sotto l'influenza delle leucocitosi, nucleinica.

3°) siero *C* di conigli immunizzati con metodo rapido (testimone).

Principiando dal siero A, ho inoculato a due conigli, di peso pressocchè uguale, la d: m: m: di ricina e 4 cmc: di siero per kgr: di animale.

Messi in osservazione, i due conigli sono morti l'uno al 3° e l'altro al 4° giorno dall'inoculazione. Evidentemente l'antitossina, contenuta nei 4 cmc: di siero, non neutralizzava la d: m: m: di ricina.

Perciò ho pensato di inoculare una dose maggiore di questo siero per altri due conigli; che hanno avuto la d: m: m: di ricina e 5 cmc: di siero A. per kgr: Questa quantità di siero ha neutralizzata perfettamente la tossina, perchè i due conigli, tenuti lungamente in osservazione, sono sopravissuti, mostrando appena un fugace malessere nei primi giorni dopo l'inoculazione.

Partendo da questa osservazione, secondo la quale viene stabilita in 5 cmc: la quantità di siero *A*, necessaria per neutralizzare la d: m: m: di ricina, io sono passato a vedere come si comporti rispetto alla tossina il siero *B* ed il siero *C*, seguendo l'istessa via, tenuta precedentemente.

Contemporaneamente ho inoculato quattro conigli, di cui, oltre alla d: m: m: di ricina, comunemente somministrata, due sono stati trattati con 4 cmc: di siero *B*, e due con 4 cmc: di siero *C* (testimone).

I due conigli, che hanno avuto il trattamento del siero *B* hanno sopportata la d: m: m: di ricina, senza mostrare neppure un transitorio disturbo; laddove i due conigli testimoni, inoculati col siero *C*, sono morti l'uno al 3° e l'altro al 5° giorno.

Questi risultati, che qui appresso si espongono, essendo abbastanza dimostrativi, mi hanno dispensato da ulteriori esperimenti.

TAVOLA IV.

Siero	Quantità	Coniglio	Esito	Azione dell' antitossina in rapporto alla quantità di siero
A Metodo ordinario	4 cmc.	N. 1	muore al 3° g.	negativo
	4 cmc.	N. 2	muore al 4° g.	negativo
	5 cmc.	N. 3	vive	posilivo
	5 cmc.	N. 4	vive	positivo
A Metodo rapido e nucleina	4 cmc.	N. 5	vive	positivo
	4 cmc.	N. 6	vive	positivo
C Metodo rapido (testimone)	4 cmc.	N. 7	muore al 3° g.	negativo
	4 cmc.	N. 8	muore al 5° g.	negativo

Osservando, che per neutralizzare la d: m: m: di ricina, 4 cmc: di siero *A* sono insufficienti, occorrendovene 5 cmc., mentre 4 cmc. del siero *B* la neutralizzano completamente, si desume agevolmente, che nel siero *B*, proveniente da animali, immunizzati con metodo rapido sotto l'azione della nucleina, si contenga una maggiore quantità di antitossina, che non nel siero *A*, ottenuto da conigli immunizzati con metodo ordinario.

La posteriore osservazione, che 4 cmc: del siero *C* proveniente da conigli immunizzati con l'istesso metodo rapido, (e che serve di controllo), non arrivano a neutralizzare la d: m: m: di ricina, non solo conferma il maggiore sviluppo di antitossina nel siero *B*, ma elimina il dubbio, che ciò fosse dovuto alla rapidità del metodo immunizzante.

Inoltre l'antitossina del siero *C* essendosi mostrata pressocchè simile a quella contenuta nel siero *A*); poichè i due conigli trattati con 4 cmc: di siero *C* sono morti senza notevole differenza da quelli, trattati con 4 cmc: di siero A), fa altresì pensare, che essa si sviluppi indipendentemente dal metodo usato per l'immunizzazione. Quest'osservazione, estranea all'argomento, è stata fatta per semplice opportunità. Riassumendo si può venire alle seguenti conclusioni:

1.º) Sotto l'influenza della leucocitosi di origine nucleinica si è ottenuto un siero, la cui antitossina si è mostrata molto più energica a conferire l'immunità.

2.º) L'antitossina, sviluppata in animali immunizzati rapidamente con forti dosi di tossina, non si è palesata più attiva di quella, sviluppatasi in animali immunizzati in più lungo tempo e con deboli quantità di tossina.

Considerazioni e Conclusioni

Nel corso di questi miei esperimenti hanno vista la luce una serie di pubblicazioni, le quali abbenchè, per i mezzi adoperati abbiano, una certa affinità con le mie ricerche, pure ne differiscono sostanzialmente per il fine, che si propongono.

Nella ricerca delle funzioni dell'elemento chimico, contenuto nella sostanza cellulare, alla cui attività si tende oggi riferire quel lavorìo biologico, che conferisce l'immunità, sono stati adoperati alcuni corpi imparentati alla nucleina, e che si conosce dalla chimica animale provenire dall'elemento nucleinico della cellula, con lo scopo di indagare quale influenza esercitassero nell'infezioni ed intossicazioni sperimentali.

H. ed A. Kossel (21) hanno dimostrato il potere battericida dell'acido nucleinico contro il colera, streptococco, stafillococco, tifo. Secondo questi AA. questo potere battericida era stato a torto da Vaugan e Clintock attribuito alla nucleina.

Posteriormente A. Kossel occupandosi degli istoni, corpi basici delle cellule, i quali risulterebbero dalla combinazione delle protamine con l'albumina, ha trovato, che le protamine uccidono un gran numero di batterii.

Le protamine però hanno azione tossica negli animali; e precipitano le albumine senza perdere o diminuire il loro potere battericida, secondo gli esperimenti di H. Kossel (22).

D'altra parte Freund, Grosz e Jelinek (23) videro, che il miscuglio di tossina difterica con una sol: di istone riusciva innocuo; come parimenti sono inattivi i filtrati dei precipitati di tossina con nucleo-istone, e di tossina difterica con acido nucleinico.

Risultati opposti ottiene Nowy (24) sperimentando nel nucleo-istone e sull'istone. Secondo questo A. il nucleo-istone, che distrugge in vitro la tossina tetanica e difterica non protegge l'animale contro le dette tossine. Identici risultati si ottengono con l'istone, che, come prima di tutti ha visto Lilin-

feld (2) spiega un'azione tossica negli animali. Nè i miscugli di nucleo-istone e tossina, e d'istone e tossina conferiscono alcuna immunità all'animale.

Come si vede, queste nuove sostanze, alcune delle quali dannose per l'animale, quantunque imparentate alla nucleina, ne differiscono più di tutto per l'azione biologica, oltrecchè per la natura biochimica.

La nucleina, che risulta dalla combinazione dell'A. nucleinico con l'albumina (26), non esercita azione distruttrice sulle tossine, e non ha azione nettamente tossica sugli animali. La proprietà biologica, universalmente riconosciutale, è quella leucotattica, a cui effetti nello stato attuale delle nostre conoscenze, si debbono riferire le più importanti modifiche, che possa indurre nell'organismo.

Ad ogni modo, facendo le debite riserve sulla relatività di questo genere di esperimenti, e sui mezzi d'osservazione, posso trarre dalle ricerche precedentemente esposte le seguenti conclusioni.

1) La leucocitosi sperimentale si è ottenuta con l'uso della nucleina; questa sostanza, il cui valore leucotattico è unanimamente riconosciuto, ha corrisposta pienamente alle esigenze sperimentali.

2) La leucocitosi rinforza notevolmente il potere antitossico naturale negli inficiamenti acuti da tossina. L' ipotesi di Bouchard (27), è la tesi di Metchinikoff e della sua scuola, sulla distruzione delle tossine per parte dei leucociti, (28) troverebbero una conferma nel risultato dei miei esperimenti, dai quali però non si desume alcuna evidente spiegazione sul meccanismo d'azione, con cui i leucociti influiscono sulla tossina.

Allo stato presente della scienza l'aumento del potere antitossico per opera della leucocitosi, non potendosi attribuire a modificazione chimica diretta dei succhi organici, (Fodor, Nuttal, Flugge, Nissen, Buchner) (29), a cui si contrasta ogni importanza, nè al fagocitismo di Metchinikoff, il cui meccanismo, spiegabile in parte contro i batterii, sembrava già troppo ipotetico contro le tossine; si puó solamente addebitare ad influenza di natura biochimica, il cui processo attualmente ci sfugge.

Secondo P. Jacob. (30) i leucociti sarebbero i trasportatori di certe sostanze depositate negli organi emopoieteci, e con esse potrebbero impegnare la lotta contro i batterii e le tossine. Secondo quest'A. l'importanza della leucocitosi nei processi patologici tossico-infettivi dovrebbe spiegarsi con i processi biochimici, e non con la teoria formulata da Metchinikoff.

A quest'opinione si accosta Maragliano (31) quando, commentando l' uso della nucleina a scopo terapeutico, dice: il concetto, che i leucociti giuocano una parte importante nelle infezioni, non tanto per il fatto del fogocitismo, quanto

per la proprietà dei leucociti di fornire o determinare lo sviluppo di mezzi difensivi, si fa strada ogni giorno e riceve sempre più conferma.

3) La leucocitosi non ha potere vaccinante nel processo di immunità attiva contro una tossina.

Ad uguale conclusione, ma per altra via, sono pervenuti Nicolas e Courmont (32), sperimentando con la tossina difterica. Questi AA. opinano, che le modificazioni dell'organismo, che produrrebbe l'immunità, sembrano potersi effettuare all'infuori del concorso del numero dei leucociti.

Le mie esperienze dimostrano altresì, che le proprietà vaccinanti restino scemate della leucocitosi sperimentale, a mezzo della nucleina.

4) Nel processo d' immunità attiva la leucocitosi sperimentale contribuisce alla formazione dell'antitossina, la quale perciò non è in alcun rapporto con le proprietà vaccinanti.

Per le moderne vedute sull'origine e formazione dell'antitossina, messe innanzi da Eherlich e confermate dai lavori di Pfeiffer, Wasserman, Ranson, (33), riferentisi ai rapporti chimici tra la tossina e certi gruppi atomici della molecola protoplasmatica, il risultato dei miei esperimenti indicherebbe, (almeno per la ricina, su cui ho sperimentato), che, o la nucleina, con cui accompagnavo l' immunizzazione, contribuisce a fornire l'elemento chimico, necessario alla formazione dell'antitossina ; o la leucocitosi, di origine nucleinica, concorra a sprigionarlo da quegli organi, che lo contengono.

L'assenza di rapporti tra il potere vaccinante e l'elaborazione di antitossina corrisponde a quanto per prima è stato trovato da Behering (34), il quale osservò, che un organismo può essere poco ricettivo al veleno, ed essere fornito di un siero dotato di un grande potere antitossico, e viceversa : cioé l'antitossina (come si è visto nei miei esperimenti) non é proporzionata alla resistenza verso i batteri e le tossine.

5) Prescindendo dalla leucocitosi , l'antitossina si sviluppa indipendentemente dalla quantità di tossina, adoperata come mezzo immunizzante.

Il siero di animali, immunizzati con forti dosi di tossina, non si è mostrato più antitossico del siero, proveniente da animali immunizzati con dosi più deboli ; e questo risultato si accorda con l'esperienza di Wasserman (35), che volendo esaminare l'apparire ed il grado dell' immunità, trovò, che la quantità di virus non vi influisca.

A termine di queste ricerche, sento il dovere di ringraziare sentitamente il Prof. A. Cardarelli per l'aiuto e benevolenza concessami.

BIBLIOGRAFIA

1 e 2) Lövvit. — Beitrage V. Ziegler 1897.
3) Semaine medicale 1893.
4) Rovighi. — Atti del congresso medico nazionale. — Roma 1894.
5) Zeitschrift für Klinische Medicin N.° XXX 1896.
6) Zagari e Pace. — Genesi dell'A. urico e della gotta p: 5-31. Napoli 1897.
7) See. Accademia di Medicina. — Parigi 1893.
8) Wiener med. Wochenschr. num. 35, 36 1893.
9) Riforma Medica V. 1' 1895, p. 404.
10) loco citato.
11) Riforma Medica. V. 2° 1895.
12) The Therapeutich Gazette. 15 giugno 1895.
13) Nëw York medical journal 2 luglio 1895.
14) Gazzetta degli Ospedali. 1899. N.°
15) Zagari e Pace. — Genesi dell'a. urico e della gotta. Napoli 1897.
16) Merk's Jaresbericht 1896
17) V. N.° 15. p. 16.
18) Calabrese. — Policlinico 1896.
19) Jaresbericht f. Thierchemie 1896 — p. 660 e Centralblatt f. innere Medicin: 16. p. 913-918
20) Zeitschrift f. phys: chemie Vol: XXI s. 90.
21) Zeitschrift f. Higiene und Infections Krankaiten. V. 27, N.° 1.
22) loco citato.
23) V. N° 19.
24) Jaresbericht f. Thier chemie v. Maly, 1897.
25) Zeitsch. f. phys: chemie Bd: XVIII. S. 473, 1894.
26) Hammarsten. — Zeitschrift f. phys. chemie Bd. VII. S. 226, 1883.
27) Bouchard. — Auutointossicazioni. Parigi 87. pag: 18.
28) Annales de Pasteur. 1894, p. 707-721.
29) V: N.° 21.
30) Zeitschrift f. k. m. V. XXX. 1896.
31) Gazzetta degli Ospedali e delle cliniche 1896.
32) Semaine medicale 1897, p; 209.
33) Riforma Medica 1898. V. 1°, N.° 61.
34) Klemperer F. e Levy E. (Batteriologia clinica. Vallardi) p: 26.
35) Zeitschrift f. Hygiene Bd: XXII. K. II. 1896.